

О ФЕНОТИПИЧЕСКОЙ ИЗМЕНЧИВОСТИ ВОЗБУДИТЕЛЯ ЧУМЫ В СВЯЗИ СО СМЕНОЙ ХОЗЯЕВ

В. А. Бибикова и Л. Н. Классовский

Среднеазиатский научно-исследовательский противочумный институт, Алма-Ата

Установлено влияние процесса циркуляции возбудителя чумы (грызун—блоха—грызун) на его фенотип, связанное с различиями в условиях существования бактерий в двух различных типах хозяев.

Возбудитель чумы — облигатный паразит. Его существование определяется возможностью непрерывной циркуляции по трансмиссивной схеме: грызун—блоха—грызун. Нетрансмиссивные способы передачи возможны, но они имеют лишь эпизодический характер и не в состоянии обеспечить сохранение микроба чумы в природе как паразитического вида.

Возможность закономерной смены хозяев обусловлена двумя особенностями возбудителя: 1) способностью вызывать у грызунов — носителей чумы — возникновение бактериемии, достаточно интенсивной для заражения кровососов; 2) способностью вызывать у блох — переносчиков инфекции — образование блока преджелудка, что обеспечивает реализацию передачи микроба укусами зараженных блох (Bacot a. Martin, 1914).

Феномен блокообразования сводится к закупорке просвета преджелудка размножающимися бактериями. Во время кровососания заблокированные блохи отрыгивают в ранку содержимое верхних отделов пищеварительного тракта вместе с клетками возбудителя чумы. Другие механизмы передачи инфекции зараженными блохами имеют второстепенный характер.

Возможность попеременного паразитирования в организмах двух различных хозяев в конечном счете определяется всем комплексом свойств возбудителя. Однако не все свойства равноценны с точки зрения их адаптивного значения.

Исследованиями последних лет показано, что высокая вирулентность возбудителя чумы, а следовательно, и способность вызывать бактериемию связаны с определенными свойствами, получившими наименование детерминант вирулентности (Burrows, 1957, 1962, 1963). К числу детерминант вирулентности относят фракцию I (FI), VW-антигены, способность к пигментообразованию (P) на среде с гемином, зависимость от ионов кальция (Ca-) при 37° и способность синтезировать пурины (Po+).

Особое значение имеют FI и VW-антигены, которые сообщают бактериям устойчивость к фагоцитозу (Chen a. Meyer, 1954; Burrows a. Bacon, 1956). Для проявления полной устойчивости бактерий к фагоцитозу необходимо наличие как FI, так и VW-антигенов (Cavanaugh a. Randall, 1959).

Значение признака зависимости вирулентных бактерий от ионов кальция при росте в условиях 37° (Higuchi, Kupferberg a. Smith, 1959; Хигучи и Смит, 1961) остается недостаточно ясным. Предполагается тесная связь этого признака с детерминантой V, W (Берруоз, 1962, 1963). Однако эта связь не является абсолютной (Акимович, Николаев и Пономарев, 1965).

Несомненно значение в проявлении вирулентности детерминанты $P+$, хотя механизм этого явления еще не расшифрован. Возможно, что детерминанта $P+$ связана со способностью микроорганизмов удовлетворять потребности в соединениях железа в организме теплокровного животного (Jackson a. Burrows, 1956, 1956a).

Потеря вирулентности может быть связана с утратой способности синтезировать пурины (Берроуз, 1957, 1962, 1963). Однако мы не придаем этому признаку особого значения. Это, по-видимому, далеко не единственный дефект питания, имеющий связь с вирулентностью. Логично предположить, что любая утрата способности бактериями синтезировать необходимое для развития клеток соединение, отсутствующее в организме хозяина, должна приводить к утрате вирулентности. Следует подчеркнуть, что для полного проявления вирулентности необходимо наличие всего комплекса перечисленных детерминант. Утрата любой из них приводит к ослаблению вирулентности.

Совсем недавно нам удалось показать, что способность возбудителя чумы вызывать закупорку преджелудка у блох определяется признаком $P+$; другие детерминанты вирулентности для процесса блокирования значения не имеют.

Таким образом, условия существования бактерий чумы оказываются расчлененными на два экологических этапа, обусловленных сменой позвоночного и членистоногого хозяев. Условия существования возбудителя в организмах столь далеко отстоящих друг от друга хозяев глубоко различны. Отсюда на каждом из двух экологических этапов функционируют различные приспособительные механизмы, которые обеспечивают микроорганизму не только существование в данных условиях, но и последующую смену хозяев. В организме теплокровного хозяина на первый план выступают те свойства возбудителя, которые определяют его высокую вирулентность (фракция I, VW-антигены, признак $P+$). В организме членистоногого переносчика важнейшее значение приобретает признак $P+$, выражающий способность бактерий чумы вызывать возникновение блока преджелудка у блох.

Явная неравноценность некоторых свойств микроба с точки зрения их адаптивного значения в разных условиях существования нашла отражение в эволюционно закрепленном явлении фенотипической изменчивости возбудителя. Экспериментально доказано, что попавшие в организм блохи бактерии чумы утрачивают способность синтезировать антигены FI и VW (Кавано и Рэндалль, 1959). Вследствие этого блоха заражает грызуна микробами чумы, не подготовленными к активному сопротивлению защитным силам хозяина. Лишенные фракции I и VW-антигенов бактерии чумы легко захватываются и разрушаются полиморфно-ядерными лейкоцитами. Однако часть микроорганизмов поглощается моноцитами, в которых бактерии не погибают, а, напротив, начинают синтезировать антигены (FI и VW), обуславливающие их устойчивость к фагоцитозу. Эти устойчивые формы возбудителя освобождаются из моноцитов и размножаются до популяций, вызывающих генерализованную инфекцию с интенсивной бактериемией (Cavanaugh a. Randall, 1959).

Главным фактором, индуцирующим фенотическую изменчивость возбудителя чумы при смене хозяев, является температура. Известно, что в организме позвоночного хозяина микроб чумы существует при $36-38^{\circ}$, а в организме кровососущего членистоногого — почти всегда при значительно более низких температурах. Способность бактерий чумы к синтезу фракции I и VW-антигенов фенотипически реализуется только при температурах, близких к 37° , и не проявляется или слабо проявляется в диапазоне более низких температур (Берроуз, 1962, 1963). Важно подчеркнуть, что проявление признака $P+$, имеющего для возбудителя адаптивное значение при существовании в организмах и грызунов и блох, не зависит от температурных условий (Джексон и Берроуз, 1956; Берроуз, 1962, 1963).

Итак, смена хозяев влечет за собой фенотипическую перестройку паразитического микроорганизма. При переходе из организма блохи в орга-

низм грызуна эта перестройка неблагоприятно сказывается на судьбе бактериальной популяции: часть микроорганизмов становится жертвой сил сопротивления организма теплокровного хозяина. Мы провели серию опытов по изучению влияния фенотипической перестройки возбудителя на судьбу его популяции на этапе перехода из грызуна в блоху. Литературные материалы, посвященные изучению этого вопроса, нам неизвестны.

В работе мы использовали штаммы возбудителя чумы, отличающиеся друг от друга генотипически по способности продуцировать фракцию I и VW-антигены. Подопытные штаммы выращивали при температурах, способствующих (37°) и угнетающих (28°) способность бактерий синтезировать фракцию I и VW-антигены. Из каждого варианта культуры готовили суспензию бактерий ($2 \cdot 10^8$ клеток в одном мл), которую (2 мл) смешивали с дефибринированной кровью кролика (3 мл). Этой смесью наполняли свежесодранные шкурки белых мышей и подсаживали на них блох *Xenopsylla cheopis*. Через четыре часа блох снимали, отбирали напившихся насекомых, из которых десять особей исследовали немедленно для определения процента зараженности свеженапившихся блох. Остальных блох содержали при комнатной температуре (22—25°), через трое суток подкармливали на здоровых белых мышах, а через пять суток индивидуально исследовали для определения конечного процента зараженности. Результаты опыта показаны в таблице.

Приживаемость возбудителя чумы в блохах в зависимости от фенотипического проявления признаков FI и VW
(Все подопытные штаммы обладали признаком P+)

№ штаммов	Температура инкубации микроорганизмов	Наличие антигенов FI и VW		Исходная зараженность (в %)	Конечная зараженность		
		генотип	фенотип		всего блох	из них абсолютная	(в %)
100 {	28°	FI+, VW+	FI—, VW—	100	60	48	80.0
	27		FI+, VW+	90	60	19	31.7
161 {	28	FI+, VW+	FI—, VW—	90	90	64	71.1
	37		FI+, VW+	80	90	6	6.7
744 {	28	FI+, VW+	FI—, VW—	100	53	17	32.1
	37		FI+, VW+	100	70	7	10.0
296 {	28	FI+, VW—	FI—, VW—	80	110	69	62.7
	37		FI+, VW—	90	110	77	70.0
814 {	28	FI—, VW+	FI—, VW—	90	98	47	47.9
	37		FI—, VW+	60	100	42	42.0
257 {	28	FI—, VW—	FI—, VW—	80	50	19	38.0
	37		FI—, VW—	80	50	19	38.0

Из приведенных данных видно, что исходная зараженность блох во всех случаях была выше конечной. Это указывает на гибель части попавших в блоху бактерий. Природа факторов, вызывающих гибель бактерий в начальный период адаптации их к условиям существования в организме блохи, остается пока неизученной. Не исключена возможность наличия в пищеварительном тракте блох веществ, обладающих бактерицидным действием (Алексеев, Бибикина и Хрусцелевская, 1968). Какой-либо зависимости исходного уровня зараженности блох от генетических и фенотипических особенностей штаммов в условиях наших экспериментов не установлено; колебания показателей исходной зараженности статистически недостоверны.

Результаты опытов дают возможность оценить влияние фенотипического состояния бактерий на их приживаемость в организме блох следующим образом.

1) Бактерии фенотипа FI—, VW— отличаются более высокой приживаемостью по сравнению с микроорганизмами того же штамма, но находящимися в фенотипическом варианте FI+, VW+ (штаммы 100, 161, 744). Это заключение базируется на высокой статистической надежности экспе-

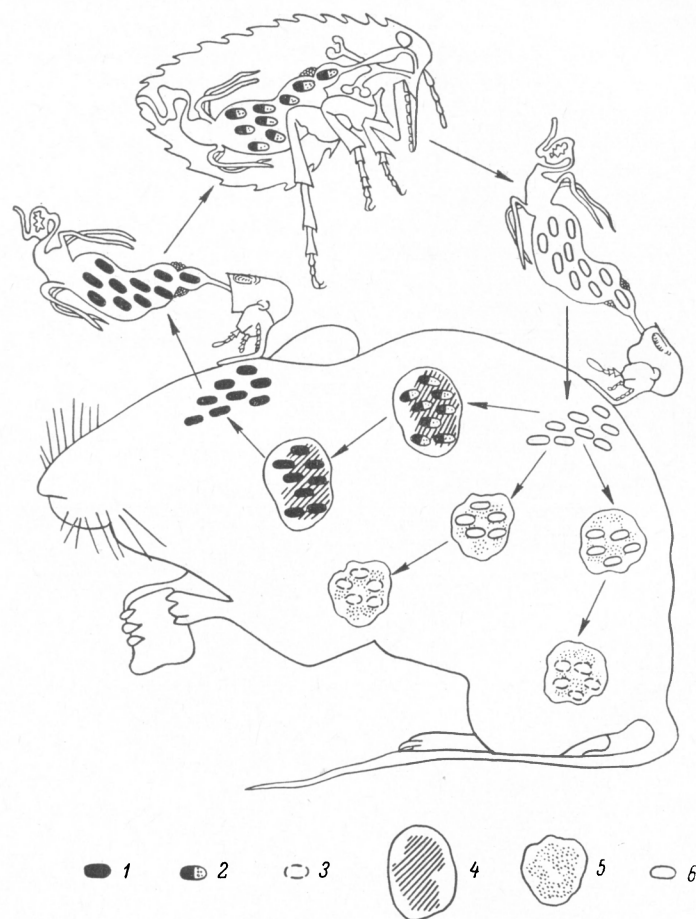


Схема цикла развития популяции микроба чумы.

1 — микробы фенотипа FI+, VW+; 2 — микробы с перестройкой фенотипа; 3 — отмирающие микробы; 4 — моноцит; 5 — сегментоядерный лейкоцит; 6 — микробы фенотипа FI—, VW—.

риментальных данных. Величина критерия X^2 для вариантов штамма 100 равна 17.27, для штамма 161 $X^2 = 75.95$ и для штамма 744 $X^2 = 8.06$. Во всех случаях эти статистические параметры превышают граничное значение $X^2_{0.1} = 6.63$.

2) Бактерии фенотипов FI+, VW— (штамм 296) и FI—, VW+ (№ 814) не отличаются по приживаемости в организме блох от фенотипических форм FI—, VW—. Различия показателей конечной зараженности блох для каждой пары фенотипических вариантов одного штамма статистически недостоверны ($X^2 < X^2_{0.5} = 3.84$).

Опыты с различными штаммами с использованием различных серий блох и крови от разных кроликов проводили не одновременно. Поэтому мы избегаем делать какие-либо выводы, касающиеся различий в заражающей способности различных штаммов. Опыты с вариантами одного штамма

во всех случаях ставили параллельно. Таким образом, происходящая в организме блохи физиологическая перестройка возбудителя (переход из фенотипа FI+, VW+ в фенотип FI—, VW—) затрудняет адаптацию микроорганизма к новым условиям существования. Значительная часть бактериальной популяции гибнет. Если в организм блохи попадают бактерии, обладающие только одним из двух антигенов (FI или VW), то вероятность выживания микроорганизмов возрастает. Это, казалось бы, должно обеспечивать селективные преимущества микроорганизмам, имеющим генотипы FI+, VW— или FI—, VW+. Однако такие формы возбудителя лишены права на длительное существование вследствие их низкой вирулентности для грызунов. Поэтому в естественных условиях утвердилась форма бактерий чумы с генотипом FI+, VW+.

Итак, в процессе циркуляции возбудителя чумы по схеме грызун—блоха—грызун происходят периодические изменения его фенотипа, что связано с особенностями условий существования бактерий в организмах двух различных хозяев. В организме теплокровного хозяина происходит наиболее полное проявление свойств, закодированных в генотипе возбудителя. В организме членистоногого переносчика часть признаков утрачивает свое адаптивное значение и фенотипически не проявляется. Фенотипическая изменчивость микроба чумы является, несомненно, следствием действия эволюционно закрепленного механизма генетической регуляции процессов обмена веществ бактериальной клетки. Главным внешним фактором, определяющим направление фенотипической изменчивости микроорганизма, является, по-видимому, температура среды. Число признаков, принимающих участие в явлении фенотипической изменчивости бактерий чумы, не исчерпывается, конечно, рассмотренными в данной работе FI и VW-антигенами. Показано, например, что температура среды оказывает влияние на характер питательных потребностей возбудителя чумы (Hills a. Spurr, 1952).

Мы рассматриваем связанное со сменой хозяев явление фенотипической изменчивости возбудителя чумы как частный случай проявления принципа экономии генов, необходимых для биосинтеза (Дэвис, 1964). С этой точки зрения генетически обусловленная регуляция процессов биосинтеза антигенов FI и VW является для бактерий чумы средством осуществления наиболее экономичного в данных условиях комплекса обменных реакций.

Фенотипическая изменчивость возбудителя имеет и теневую сторону в виде пониженной жизнеспособности клеток, претерпевающих физиологическую перестройку. Это делает смену хозяев наиболее уязвимым этапом развития бактериальной популяции. Однако этот этап успешно преодолевается с помощью механизмов, обеспечивающих проникновение в организм очередного хозяина относительно большого числа бактерий (интенсивная бактериемия у грызунов и блок преджелудка у блох). Так, например, В. А. Бибиковой с А. Н. Алексеевым и Н. М. Хрустелевской определено, что блокированная блоха *X. cheopis* может передать при укусе до 30 000 микробных клеток. Выживание даже небольшого, но успешно завершившего перестройку числа бактерий оказывается достаточным для дальнейшего развития популяции.

Описанная схема развития бактериальной популяции дает право говорить о жизненном цикле возбудителя чумы. Под этим термином в общей паразитологии понимают совокупность следующих друг за другом стадий развития организма, заключенных между двумя определенными моментами. Один из них произвольно принимается за начальный, другой — за конечный, после чего жизненный цикл начинается заново (Догель с соавторами, 1962). Для жизненного цикла микроба чумы (см. рисунок) характерен метаксеноз (Ross, 1910), т. е. регулярное чередование поколений в организмах двух типов хозяина — позвоночного и членистоногого. Смена хозяев сопровождается перестройкой некоторых приспособительных механизмов возбудителя.

Л и т е р а т у р а

- А к и м о в и ч В. В., Н и к о л а е в Н. И., П о н о м а р е в Н. Г. 1965. Антигенная структура бактерий чумы, зависимых и не зависимых при 37° от ионов кальция. В сб.: Вопросы микробиологии и лабораторной диагностики особо опасных инфекций, Саратов: 3.
- А л е к с е е в А. Н., Б и б и к о в а В. А., Х р у с ц е л е в с к а я Н. М. 1968. Некоторые доказательства существования бактерицидного фактора в организме кровососов на примере блох — переносчиков чумы. Паразитология, 2 (2) : 115—123.
- Д о г е л ь В. А., П о л я н с к и й Ю. И., Х е й с и н Е. М. 1962. Общая протозоология. Изд. АН СССР, М.—Л.: 1—591.
- Д э в и с Б. 1964. Вступительное слово: телеономическое значение регуляторных механизмов биосинтеза. В сб.: Регуляторные механизмы клетки. Изд. «Мир», М.: 9.
- В а с о t A. a. M a r t i n C. 1914. Observations on the mechanism of the transmission of plague by fleas. Journ. of Hyg., B, Plague Suppl., 3 : 423.
- B u r r o w s T. W. 1957. Virulence of *Pasteurella pestis*. Nature, 179 (4572) : 1246.
- B u r r o w s T. W. 1962. Genetics of virulence in *Bacteria*. Brit. Med. Bull., 18 (1) : 69.
- B u r r o w s T. W. 1963. Virulence of *Pasteurella pestis* and immunity to plague. Ergebn. Microbiol. Immunitats, 37 : 59.
- B u r r o w s T. W. a. В а с о n G. A. 1956. The basis of virulence in *Pasteurella pestis* an antigen determining virulence. Brit. J. Exp. Pathol., 37 (5) : 481.
- С а в а n a u g h D. C. a. R a n d a l l R. 1959. The role of multiplication of *Pasteurella pestis* in mononuclear phagocytes in the pathogenesis of flea-borne plague. J. Immunol., 83 (4) : 348.
- H i g u c h i K., K u p f e r b e r g L. L. a. S m i t h J. L. 1959. Studies on the nutrition and physiology of *Pasteurella pestis*. III. Effects of calcium ions on the growth of virulent and avirulent strains of *Pasteurella pestis*. J. Bacteriol., 77 : 317.
- H i g u c h i K. a. S m i t h J. L. 1961. Studies on the nutrition and physiology of *Pasteurella pestis*. VI. A differential plating medium for the estimation of the mutation rate to avirulence. J. Bacteriol., 81 (4) : 605.
- H i l l s G. M. a. S p u r r E. D. 1952. The effect of temperature on the nutritional requirements of *Pasteurella pestis*. J. Gen. Microbiol., 6 : 64.
- J a c k s o n S. a. B u r r o w s T. W. 1956. The pigmentation of *Pasteurella pestis* on a defined medium containing haemin. Brit. J. Exp. Pathol., 37 : 570.
- J a c k s o n S. a. B u r r o w s T. W. 1956a. Virulence-enhancing effect of iron on nonpigmented mutants of *Pasteurella pestis*. Brit. J. Exp. Pathol., 37 : 577.
- R o s s R. 1910. Possible effect of malaria on the anophelines. In «The Prevention Malaria». London : 187—198.

ON PHENOTYPIC VARIABILITY OF THE CAUSATIVE AGENT OF PLAGUE IN RELATION TO THE CHANGE OF HOSTS

V. A. Bibikova and L. N. Klassovsky

S U M M A R Y

During the «rodent—flea—rodent» circulation of the causative agent of plague some periodical changes occur in the agent's phenotype. These changes are associated with various conditions of existence of bacteria in the organisms of two different hosts: vertebrate animal and flea. The above scheme of the development of the bacterial population suggests the life cycle of the agent of plague — obligate parasite.